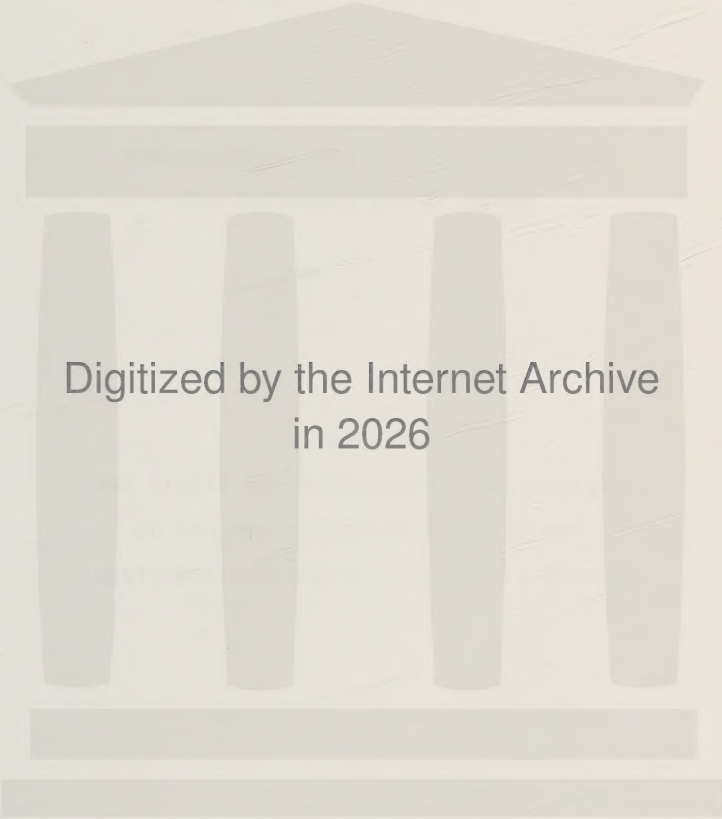


PROCOLLAGEN - III - PEPTID IM SERUM BEI PATIENTEN MIT M. CROHN

Peter Kaltenthaler

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555213_0032

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

**PROCOLLAGEN - III - PEPTID IM SERUM
BEI PATIENTEN MIT M. CROHN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Kaltenthaler

aus
Marktredwitz

Jahr

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Loeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn
Prof. Dr. med. M. Knedel

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 19. Mai 1988

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

- 1.1 Pathologie des M.Crohn
- 1.2 Vorkommen von Kollagen-III- im Darm
- 1.3 Vorkommen von Kollagen-III- und anderen
Kollagen-Typen in verschiedenen Geweben
- 1.4 Biochemie des Prokollagen-III-Moleküls
- 1.4.1 Struktur des Prokollagen-III-Moleküls
- 1.4.2 Intrazelluläre Syntheseschritte
- 1.4.3 Extrazelluläre Syntheseschritte
- 1.5 Nachweis von Prokollagen-III- und anderen
Parametern des Kollagenstoffwechsels
- 1.6 Prokollagen-III-Peptid im Serum bei
verschiedenen Erkrankungen
- 1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

2 METHODIK

- 2.1 Auswahl des Patientenkollektivs
- 2.2 Aktivitätsindex nach Best
- 2.3 Radioimmunoassay zur Bestimmung von
Prokollagen-III-Peptid
- 2.3.1 Prinzip
- 2.3.2 Entwicklung des Radioimmunoassays
- 2.3.3 Durchführung des Radioimmunoassays
- 2.3.3.1 Gewinnung und Aufbewahrung der Serumproben
- 2.3.3.2 Verwendete Geräte
- 2.3.3.3 Verwendete Reagenzien
- 2.3.3.4 Testansatz
- 2.3.3.5 Verdünnungsreihe für Standards und Serumproben

- 2.3.3.6 Inkubation mit Anti-Prokollagen-III-Peptid-Serum
- 2.3.3.7 Inkubation mit Radioaktivität
- 2.3.3.8 Inkubation mit zweitem Antikörper
- 2.3.3.9 Zentrifugation und Dekantieren
- 2.3.3.10 Messung der Radioaktivität
- 2.3.4 Auswertung

3 ERGEBNISSE

- 3.1 Serumkonzentration bei Gesunden und bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung
- 3.2 Darstellung der Prokollagen-III-Peptidspiegel nach verschiedenen Gesichtspunkten des M.Crohn
- 3.3 Prokollagen-III-Peptidspiegel bei Leberfibrose
- 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4 DISKUSSION

- 4.1 Methodik
 - 4.1.1 Veränderung des Testbestecks
 - 4.1.2 Bedeutung der Antigenität für den Radioimmunoassay
- 4.2 Zu den Ergebnissen
 - 4.2.1 Normbereich
 - 4.2.2 Prokollagen-III-Peptidspiegel bei M.Crohn
 - 4.2.3 Prokollagen-III-Peptidspiegel bei Leberfibrose

5 ZUSAMMENFASSUNG

6 LITERATURVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

In dieser Arbeit wird untersucht, ob die Bestimmung von Prokollagen-III- (Pk-III-) Peptid im Serum zur Diagnostik bzw. Verlaufs-kontrolle chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen herangezogen werden kann.

1.1 Pathologie des M.Crohn

Die Crohn'sche Erkrankung ist eine chronische Entzündung, die den gesamten Magen-Darm-Trakt betreffen kann, vorzugsweise aber im terminalen Ileum und im Kolon lokalisiert ist.

Histopathologisch charakteristisch sind Epitheloidzellgranulome mit Riesenzellen vom Langhans-typ in der Mukosa, Submukosa und Muskularis sowie eine allgemeine lymphoretikuläre Hyperplasie mit Lymphödem, Lymphangiektasie und lymphozytärer Infiltration (14, 41, 55). Fissuren und intramurale Abszesse sind häufig Ausgangspunkte für die Entstehung transmuraler Fisteln. Durch Ödembildung ist die gesamte Darmwand verdickt.

Im chronischen Stadium der Erkrankung kommt es zur Bindegewebsbildung durch Fibroblasten, besonders in der Submukosa und Muskularis propria. Die anfänglich ödematöse Verdickung und später hinzutretende Fibrose können zur Stenose einzelner Darmabschnitte führen (41, 54, 55).

1.2 Vorkommen von Kollagen-III- im Darm

Untersuchungen über das Vorkommen der verschiedenen Kollagentypen im menschlichen Körper haben einen vergleichsweise hohen Anteil von Typ-III-Kollagen im Darm gezeigt (19, 41).

J.D'Ardenne konnte mit Immunfluoreszenz-Methoden eine Verteilung von Typ-III-Kollagen unter dem Epithel, in der Lamina propria, der Submukosa, der Subserosa, in der Muskularis propria sowie im Bereich der Lymphfollikeln nachweisen (16).

Möglicherweise kommt es im Rahmen der Fibrose zu einem deutlichen Kollagenanstieg im Gewebe und im Serum.

1.3 Vorkommen von Kollagen-III- und anderen Kollagen-Typen in verschiedenen Geweben

Die verschiedenen Kollagen-Typen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer molekularen Strukturen sowie ihres Vorkommens im Körper.

Typ-I-Kollagen macht 90% des Körperkollagens aus. Es kommt in den meisten inneren Organen sowie in Knochen, Sehnen und Faszien vor.

Typ-III- zeigt eine ähnliche Verteilung wie Typ-I-, findet sich dagegen nicht im Knochen. Das Verhältnis von Typ-III- zu Typ-I-Kollagen ist in der Fetalzeit und im Frühstadium von Fibrosen zugunsten von Typ-III- verschoben (40, 49).

Eine Übersicht über die Verteilung verschiedener Kollagen-Typen im Körper gibt Tab. I.

Tab. I Vorkommen verschiedener
Kollagen-Typen in menschlichen
Organen (21, 32, 40, 41, 49)

Kollagen-Typ	Organe
-I-	Knochen, Sehnen, Faszien, Arterien, Herz, Haut, innere Organe
-II-	Hyaliner Knorpel
-III-	Retikuläres Gewebe, innere Organe, Arterien, Herz, Muskeln, Uterus
-IV-	Basalmembranen u.a. von Leber, Lunge, Nieren
-V-	Basalmembranen
-I-Trimer	Dentin, Haut, Leber bei Leberzirrhose

1.4 Biochemie des Prokollagen-III-Moleküls

1.4.1 Struktur des Prokollagen-III-Moleküls

Der biosynthetische Vorläufer von Kollagen ist Prokollagen. Die verschiedenen Prokollagen-Typen unterscheiden sich nur durch kleinste strukturelle Modifikation voneinander. Ein Pk-III-Molekül (Abb.1) besteht aus 3 gleichartigen Polypeptidketten, die untereinander spiralgig zu einer Tripelhelix angeordnet sind (11, 59, 67).

Jeweils am Ende befindet sich eine Carboxy- bzw. eine Amino-Gruppe mit überwiegend globulärer Struktur (47). Diese sind über nicht-helikale sogenannte Telopeptide mit der zentralen Tripelhelix verbunden.

Das NH_2 -terminale Ende umfaßt ca. 150 Aminosäuren (AS), das carboxy-terminale ca. 96 AS. Insgesamt ist eine alpha-Kette ca. 1500 AS lang (5, 12, 56).

Die Molekulargewichte betragen 21000 für das NH_2 -terminale Ende, 35000 für das COOH -terminale Ende und 95000 für die Kollagenkette, also insgesamt ca. 150000 (47).

Die AS sind dabei in einer typischen Sequenz angeordnet (Gly-X-Y). X und Y können durch verschiedene AS besetzt sein. X ist häufig Prolin, Y häufig Hydroxyprolin. Lediglich die Telopeptide weisen nicht diese typische Sequenz auf (29, 36).

Die alpha-Ketten untereinander sind über Disulfidbrücken an 3 Positionen verbunden: im NH_2 -terminalen Ende, im COOH -terminalen Ende sowie im Kollagenanteil, welcher der Carboxy-Gruppe benachbart liegt (4, 13, 24).

Den Aufbau des amino-terminalen Propeptids gibt Abb.2 wieder. Es setzt sich aus 3 Teilstücken Col 1 - 3 zusammen.

Col 1 mit einer Länge von 97 AS ist über 12 Cysteinreste quervernetzt. Col 2 besteht aus einem 28 AS langen, nicht-helikalen über Disulfidbrücken verbundenen Teilstück und einem 20 AS langen Telopeptid (12, 47, 70).

Zwischen Col 1 und Col 2 befindet sich als kollagener Bestandteil mit einem hohen Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin das Col 3 - Segment.

Das COOH-terminale Ende besteht zu 2/3 aus einem helikalen und zu 1/3 aus einem nicht-helikalen Segment. In der Verbindung beider Teilstücke liegen 2 Cysteinreste zur Bildung von Disulfidbrücken, während die Spirale die typische Glycinsequenz aufweist (27).



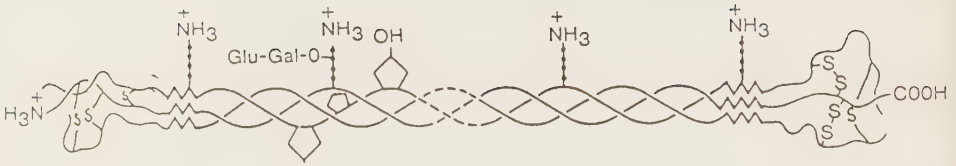
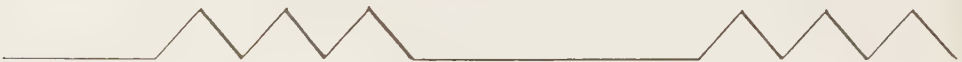


Abb. 1 Schema des vollständigen Pk-III-Moleküls

AMINOPROPEPTID			TELOPEPTID	
GLOBULÄR	KOLLAGENARTIG	NICHTHELIKAL		KOLLAGENHELIX
12 Cys		3 Cys	14	79



97	33	28	20	AS
Col1	Col3	Col2		
11000	5000	5000		MG

Abb. 2 Amino-terminales Propeptid des Pk-III-Moleküls
Mod. nach Fessler (23)

1.4.3 Extrazelluläre Syntheseschritte

Im Extrazellulärraum findet eine schrittweise Abspaltung der terminalen Propeptide durch spezifische Peptidasen statt, wodurch das Kollagenmolekül entsteht (17, 28).

Durch Abspaltung zunächst des amino-terminalen, dann des carboxy-terminalen Endes entsteht das Tropokollagenmolekül (17, 25, 61).

Die Quervernetzung zu Polymeren (Abb.4) unterliegt einer oxidativen Desaminierung von Lysyl und Hydroxyllysyl-Gruppen zu Aldehyden, die untereinander und mit anderen Amino-Gruppen kovalente Bindungen eingehen (60).



Abb. 4 Schema intra- und intermolekulärer Quervernetzung,
wobei  alpha-Ketten
 Aldehyd-Gruppen
 beta-Amino bzw. andere reaktive Gruppen

Mod. nach Tanzer (60)

1.5 Nachweis von Prokollagen-III- und anderen Parametern des Kollagenstoffwechsels

Nach Sezernierung in den Extrazellulärraum ist das Pk-III-Peptid für eine gewisse Zeit im Blut, aber auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Aszites, Urin, Synovia und Liquor nachzuweisen (31, 32).

Das Peptid wird renal ausgeschieden und kann bei Nierenfunktionseinschränkung im Serum in bis zu 8-facher Konzentration nachgewiesen werden.

Im Blut scheint ein weiterer Abbau von Pk-III-möglich zu sein, da man auch Abbauprodukte kleineren Molekulargewichts im Urin gefunden hat (52). Bei einer bestimmten Peptidkonzentration im Blut soll die Kollagenproduktion über einen Feedback-Mechanismus gehemmt werden, wie Untersuchungen an Fibroblastenkulturen nahelegen (70).

Aus der Kollagen-III-Biosynthese ergeben sich noch eine Reihe weiterer diagnostischer Parameter zur Erfassung des Kollagenstoffwechsels. Dies sind Prolin, Hydroxyprolin, Prolylhydroxylase, Lysyloxidase und Kollagenase (32). Sie haben bisher nur beschränkte klinische Bedeutung erlangt.

1.6 Prokollagen-III-Peptid im Serum bei verschiedenen Erkrankungen

Nachdem eine Beurteilung von Erkrankungen, die mit Fibrose einhergehen, bisher lediglich aufgrund histologisch-morphologischer Kriterien möglich war, sind in letzter Zeit eine Reihe klinisch-chemischer Verfahren zur Erfassung der Bindegewebs- bzw. Kollagen-Neubildung entwickelt worden.

Radioimmunologisch ist die Bestimmung der endständigen Peptide von Pk-III-, aber auch von Pk-I- in Mengen von weniger als 1 ng/ml möglich geworden (52).

Bisher wurden Untersuchungen an Patienten mit Morbus Paget, primär chronischer Polyarthrit, Lungenfibrose und vor allem fibrosierenden Lebererkrankungen durchgeführt (32, 33, 38, 52, 63). Bei den zuerst genannten Erkrankungen wurden bisher nur inkonstante Veränderungen gesehen, während bei Leberzirrhose bis zu 14-fache Pk-III-Peptid-Erhöhungen im Serum gefunden wurden. Besonders im Frühstadium der Fibrose scheint Pk-III-Peptid erhöht zu sein (49).

Wahrscheinlich kann der Prokollagenspiegel im Serum als Parameter für die aktuelle Kollagensynthese bzw. für den Kollagenumsatz gelten (32, 33, 52).

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Da der M.Crohn mit einer vermehrten Bindegewebsbildung in der Darmwand einhergeht, sollen in der vorliegenden Arbeit die Pk-III-Peptidspiegel im Serum von Patienten mit dieser Erkrankung bestimmt werden. Erhöhte Spiegel könnten Hinweise auf die Aktivität der Erkrankung geben.

Die Werte sollen mit den Prokollagenspiegeln bei gesunden Kontrollpersonen, bei Colitis ulcerosa und bei Patienten mit fibrosierenden Lebererkrankungen verglichen werden.

Untersuchungen über Pk-III-Konzentrationen bei Patienten mit M.Crohn liegen bisher nicht vor, wohingegen erhöhte Serumkonzentrationen bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen bereits beschrieben wurden.

2 METHODIK

2.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Die Patienten, deren Serumprokollagenspiegel in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, entstammen ausschließlich der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

Die 54 an M. Crohn leidenden Patienten suchten dort im Zeitraum von Juni 1981 bis Dezember 1983 entweder die gastroenterologische Ambulanz auf oder sie unterzogen sich einer stationären Behandlung. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Patienten altersunabhängig mit einem Gipfel zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr untersucht.

Die Diagnose des M. Crohn war aufgrund klinischer, endoskopisch-histologischer und radiologischer Standardkriterien gestellt worden. Das Krankheitsbild stellte sich in unterschiedlicher Form und Ausprägung dar, was den Befall verschiedener Darmabschnitte, Komplikationen, Dauer und Aktivität sowie Art der Therapie angeht.

Bei den meisten untersuchten Patienten waren das terminale Ileum und die proximalen Kolonabschnitte befallen, bei einigen Duodenum, distales Kolon und Rektum (22).

Hinsichtlich der Therapie kamen Salazosulfa-pyridin und Metronidazol, in Fällen stark entzündlicher Schübe Prednison bzw. Prednisolon sowie allgemeine Maßnahmen wie Substitution von Ernährungsdefiziten oder Antidiarrhoika zum Einsatz. Einige Patienten wurden nur symptomatisch behandelt.

Bei Versagen konservativer Maßnahmen waren intestinale Teilresektionen, entsprechend der befallenen Darmabschnitte, angezeigt, nach denen ein eventuelles Rezidiv koloskopisch gesichert oder ausgeschlossen war.

Serumprokollagen wurde auch bei 9 Patienten mit Colitis ulcerosa, 16 freiwilligen gesunden Kontrollpersonen und 22 chronisch Leberkranken bestimmt.

Die Diagnose einer Leberzirrhose, meist alkoholbedingt, oder einer chronisch-aktiven Hepatitis war in den meisten Fällen histologisch gesichert.

2.2 Aktivitätsindex nach Best

Die Höhe der Prokollagenspiegel sollte in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Parametern der Crohn'schen Erkrankung korreliert werden. Dazu wurde insbesondere die Krankheitsaktivität mit Hilfe des "Crohn's Disease Activity Index" (CDAI) aus der National Cooperative Crohn's Disease Study nach Best (8) ermittelt.

Hiernach besteht bei einem Index unter 150 eine Erkrankung leichteren Grades, bei über 150 höheren Grades sowie ein sehr schwerer Verlauf bei einem Index von über 450.

Der Index wertet vor allem subjektive und objektive klinische Parameter und zieht als einzigen Laborwert den Hämatokrit heran.

Der Index errechnet sich aus der Summe einzelner Kriterien, die je nach Aussagekraft und Spezifität mit einem entsprechenden Faktor multipliziert werden. Im einzelnen sind folgende Parameter enthalten:

- | | |
|---|--------------|
| 1) Anzahl weicher Stühle oder Durchfälle in der letzten Woche | x 2 |
| 2) Grad der Bauchschmerzen (Summe über 1 Woche) | x 5 |
| 3) Allgemeinbefinden (Summe über 1 Woche) | x 7 |
| 4) Symptome, die häufig mit M.Crohn assoziiert sind (Gelenkschmerzen, Uveitis, Erythema nodosum, Stomatitis aphthosa, Analfissuren, -fisteln, -abszesse, Temperaturen über 37,5°) jeweils | x 20 |
| 5) Symptomatische Durchfallbehandlung | wenn ja x 30 |
| 6) Resistenz im Abdomen
nein = 0, fraglich = 2, sicher = 5 | x 10 |
| 7) Hämatokrit (- 42 für ♀, - 47 für ♂) | x 6 |
| 8) K-Gewicht: $1 - \frac{\text{Gewicht}}{\text{Standardgewicht}}$ | x 10 |

Die Punkte 1 - 3 werden aus einem "Wochenbericht" abgeleitet, in dem der Patient seine Beschwerden graduiert und in der Woche vor Blutentnahme täglich einträgt.

2.3 Radioimmunoassay zur Bestimmung von Prokollagen-III-Peptid

Zur Bestimmung des Pk-III-Peptids im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten entwickelten Rohde et al. einen Radioimmunoassay (RIA), der speziell das NH₂-terminale Ende des Prokollagen-Moleküls erfaßt (52).

Der Test hat eine untere Nachweisgrenze von ca. 1 ng/ml, ist präzise und gut reproduzierbar (42).

2.3.1 Prinzip

Das Prinzip der Methode beruht auf einem Inhibitionsradioimmunoassay mit Doppelantikörpertechnik.

Wie Abb.5 zeigt, wird das unbekannte Antigen (Ag) mit einer konstanten Menge Antikörper (Ak) (von Kaninchen) inkubiert, bis ein Gleichgewicht herrscht. Nach Zugabe eines radioaktiv markierten Ag* konkurriert dieses mit dem nicht markierten Ag um Bindungsstellen am Ak. Es befinden sich Ag* - Ak-Komplexe und freies, markiertes Ag* gleichermaßen in Lösung.

Um die Komplexe zu präzipitieren und sie vom freien, markierten Ag* zu trennen, setzt man einen zweiten Antikörper (von Ziegen) hinzu, der gegen die antigenen Strukturen des ersten Ak gerichtet ist.

Gemessen wird schließlich die Radioaktivität im Präzipitat, die als Maß für die Verdrängung am Ak gelten kann und damit indirekt die Menge an unbekanntem Ag anzeigt.

Je mehr Radioaktivität in den präzipitierten Komplexen erscheint, desto weniger Ag (Pk-III-) befindet sich im Serum. Der zweite Ak darf nicht mit dem Ag interferieren und soll im Überschuß angewendet werden, um sicher alle Komplexe binden zu können (42, 64).

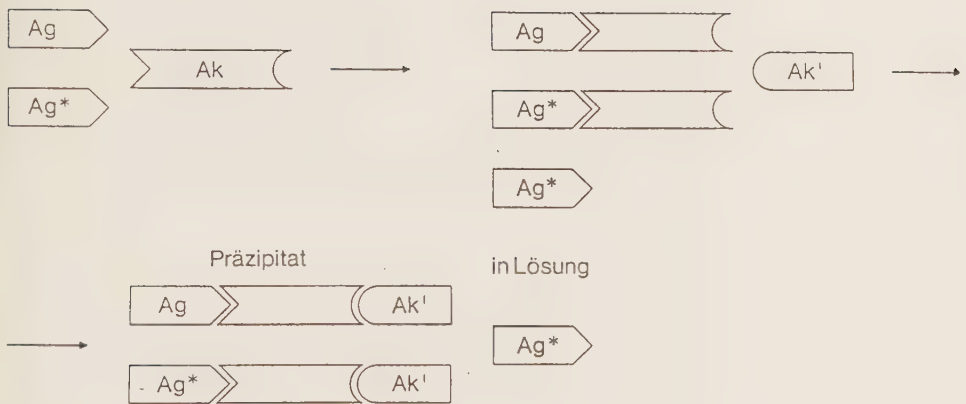


Abb.5 Schema des Inhibitionsimmunoassays
mit Doppelantikörpertechnik, wobei

Ag = unbekanntes Antigen
Ag* = radioaktiv markiertes Rinderantigen
Ak = Kaninchenantikörper
Ak' = Ziegenantikörper

2.3.2 Entwicklung des Radioimmunoassays

Das Material zur Entwicklung des RIA stammt aus fetaler Rinderhaut. Nowack und anderen Untersuchern gelang es, natives Pk-III- zu extrahieren. Durch weitere Behandlung mit Kollagenasen ließ sich das amino-terminale Ende Col 1 - 3 aus dem Prokollagen-Molekül isolieren (12, 47).

Dieses Col 1 - 3 erwies sich als Struktur mit starker Antigenität zur Erzeugung von Antikörpern. Die Messung von Pk-III- im Serum bezieht sich daher allein auf das amino-terminale Ende Col 1 - 3. Durch Immunadsorption konnte eine so hohe Spezifität der Antigene erreicht werden, daß eine Kreuzreaktion mit anderen Prokollagen-Typen (z.B. Pk-I-) vermieden wird.

Rinderprokollagen wurde gewählt, weil es in hohem Maße mit menschlichem Kollagen kreuzreagiert. Für die Anwendung bei der Prokollagen-Messung am Menschen erscheint es deshalb sinnvoller als Material anderer Säugetiere (5, 46, 51, 62, 65, 69).

Das Col 1 - 3 - Peptid wurde nach der Chloramine T - Methode mit $0,5 \text{ mCi } J^{125}$ (New England Nuclear Chemicals, Dreieichenhain) radioaktiv markiert. Chloramine T ist das Na-Salz des N-monochloro-p-toluensulfamids. Es ist in der Lage, bei neutralem pH und Zimmertemperatur in Gegenwart von $0,5 \text{ Na } J^{125}$ Jod zu oxidieren. Das Jodanion verbindet sich dann selektiv mit Thyroxinresten, die im Col 1 - 3 - Peptid vorhanden sind. J^{125} wird gegenüber J^{131} wegen der längeren Halbwertszeit (60 gegenüber 8 Tagen) und der größeren Zähleffizienz bevorzugt (30, 42).

Das markierte Material, auf 2,5 ml mit PBS (Phosphate-buffered saline) verdünnt, enthielt zusätzlich 0,4% Tween 20, ein nicht-ionisches Detergens, das die unspezifische Bindung von Ag* auf ein Mindestmaß beschränkt (20, 64).

Der erste Antikörper wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit Col 1 - 3 gewonnen. Zunächst wurde das Protein mit Freund's Adjuvans, das einen Emulsifikator, Mineralöl und nicht-tuberkulöse Mukobakterien enthält, angereichert, um die Antigenität zu steigern.

Nach subkutaner und intraperitonealer Impfung der Tiere ließ sich nach 12 Wochen das Antiserum gewinnen. Diese Kaninchenantikörper (Immungammaglobuline) wurden als Antigen für die Erzeugung des zweiten Antikörpers durch Impfung von Ziegen bereitet (5, 42).

2.3.3 Durchführung des Radioimmunoassays

Die PK-III-Bestimmung in der vorliegenden Arbeit wurde nach dem Muster des von Rohde et al. entwickelten RIA durchgeführt. Über die Firma Behringwerke AG, Marburg, ist der Test kommerziell als RIA-gnost^(R) Prokollagen-III-Peptid verfügbar (6, 52).

2.3.3.1 Gewinnung und Aufbewahrung der Serumproben

Jedem Patienten wurde eine Menge von ca. 10 ml Nativblut abgenommen. Nach 30 - 60 Minuten wurde das Serum durch Zentrifugation abgetrennt, in geeignete Serumröhrchen abpipetiert und bei mindestens minus 20° Celsius in Aliquots von mindestens 5 ml gelagert.

2.3.3.2 Verwendete Geräte

Bei der Durchführung des RIA kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- Gesamtstrahlenmeßplatz (Gesamtszint BF 5300, Berthold, Wildbad)
- Kühltruhe bis minus 20° (Bosch)
- Glaspipetten
- Zentrifuge, kühlbar auf 4° Celsius, Mindestumdrehungszahl 1500/Min.
(PR - 6000, Damon - IEC Division, Klunc GmbH)
- Zentrifuge (Heraeus Christ GmbH, Osterode/Harz)
- Inkubationsröhrchen mit 3 - 5 ml Inhalt
- Eppendorf Mikroliterpipetten mit austauschbarer Kunststoffspitze
- Mischrotor bzw. Magnetrührer (Internationale Laboratoriums - Apparate GmbH, Dottingen)
- Großflächiges Gestell für Serumröhrchen in großer Stückzahl (200 Stück - eigene Anfertigung)
- Eppendorf Multipipette
- Rüttler (Janke & Kunkel, Ika-Werk)

2.3.3.3 Verwendete Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

- Standard-Prokollagen als Lyophilisat
- Testserum als Lyophilisat
- Verdünnungspuffer (2 Tabletten)
- Anti-Pk-III-Peptid-Serum als Lyophilisat
- Trennreagenz 110 ml als gebrauchsfertige Suspension
- J¹²⁵-Pk-III-Peptid als Lyophilisat

2.3.3.4 Testansatz

Zunächst werden die Inkubationsröhrchen markiert bzw. durchnummeriert und anschließend auf dafür geeignete Gestelle aufgereiht. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, ein Tablett (A) für den Ansatz der Serumverdünnungen und ein Tablett (B) für die weiteren Arbeitsgänge, d.h. die Inkubation der angefertigten Verdünnungen, zu verwenden.

Alle Serumproben wurden dreifach angesetzt.

Die Anzahl der Röhrchen in einem RIA soll ausreichen, um $S_0 - S_5$ Standardlösungen, Seren einiger Kontrollpersonen, von Leberfibrosepatienten sowie mehrerer an M. Crohn erkrankter Personen im gleichen Ansatz bestimmen zu können. Unter Einbeziehung jeweils von Dreifach-Bestimmungen sind die Reagenzien eines Bestecks insgesamt für maximal 200 Teströhrchen vorgesehen.

2.3.3.5 Verdünnungsreihe für Standards und Serumproben

Nach Auftauen der Seren und Auflösen der Puffer-tabletten in 200 ml destilliertem H_2O mittels Magnetrührer werden die Seren bzw. Standards nach dem in Tab.II dargestellten Schema mit der Pufferlösung verdünnt. Dabei werden für die Seren von Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa sowie für die Normalseren weniger starke Verdünnungen benötigt als für die Seren der Fibrosepatienten. Es soll jeweils eine Verdünnung oberhalb bzw. unterhalb des 50% B/B_0 -Wertes liegen. Auf die Verwendung jeweils neuer Pipettenspitzen ist zu achten.

Nachdem die Standards und die verdünnten Serumproben auf dem Mischrotor durchmischt worden sind, werden aus jeder einzelnen Probe 200 μl

Aliquots in die Röhrchen des Tablett (B) pipettiert. Wie bereits erwähnt, werden für jede Verdünnungsstufe Triplikate angesetzt.

Tab. II Verdünnungsreihe, wobei Seren von Patienten mit M.Crohn 1:2, 1:8, 1:32, mit Leberfibrose 1:4, 1:16, 1:64 verdünnt werden.

	1:2	1:8	1:32	1:4	1:16	1:64
[μ l] Serum	400	100	50	300	→300	→300
[μ l] Puffer	400	700	1550	900	900	900

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
[ml] Serum		1 aus S ₂	1 aus S ₃	1 aus S ₄	1 aus S ₅	1 aus S ₆	2
[μ l] Puffer	1000	1000	1000	1000	1000	1000	0

2.3.3.6. Inkubation mit Anti-Prokollagen-III-Peptid-Serum

Sowohl der Standard als auch der erste Ak und das radioaktiv markierte Ag* liegen in lyophilisierter Form in kleinen Fläschchen vor. Die Auflösung in destilliertem Wasser verlangt besondere Sorgfalt, um Schaumbildung zu vermeiden und für vollständige Durchmischung zu sorgen. Dazu wird das Fläschchen aufgestoßen, um am Stopfen haftende Partikel abzulösen. Dann entfernt man Abrißkappe und Gummistopfen vorsichtig und gibt die jeweilige Menge destilliertem

H₂O mit geeigneter Glaspipette dazu. Der Lösungsvorgang kann durch vorsichtiges Schütteln unterstützt werden.

In der beschriebenen Weise wird das Anti-Pk-III-Peptid-Serum in 20 ml destilliertem H₂O aufgelöst, und mit einer Multipipette 100 µl Ak-Lösung auf jedes Teströhrchen der Verdünnungsreihe verteilt. Nach Mischen der Lösung wird das Reagenzglasgestell mit einer Stanniolfolie abgedeckt und im Kühlschrank bei 0 - 6° Celsius für 16 - 24 Stunden inkubiert.

2.3.3.7 Inkubation mit Radioaktivität

Nach Ablauf der Inkubationszeit dispensiert man 100 µl des radioaktiv markierten Ag* auf die Verdünnungsreihe, wobei ein Röhrchen ausschließlich der Bestimmung der Gesamtaktivität vorbehalten bleibt. Nach dem Mischen wird für weitere 7 Stunden im Kühlschrank inkubiert.

2.3.3.8 Inkubation mit zweitem Antikörper

Im folgenden Arbeitsgang wird der zweite Ak, das Trennreagenz, als gebrauchsfertige Lösung (Tachisorb ^(R)) in Mengen von 500 µl in die Röhrchen pipettiert und auf dem Mischrotor gemischt.

2.3.3.9 Zentrifugation und Dekantieren

Nach einer Inkubation von wiederum 16 - 24 Stunden werden die Proben 20 Minuten lang bei 4° Celsius mit mindestens 1500 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Es entsteht ein weißlicher Niederschlag, in dem die komplexgebundene Radioaktivität enthalten ist, sowie ein etwa

2 cm langer Überstand mit den gebundenen Ag - Ak - Komplexen. Der nun folgende Schritt in der Durchführung des Assays, das Dekantieren des Überstands, ist kritisch und verlangt daher besondere Sorgfalt.

Nach Stillstand der Zentrifuge werden die Röhrchen in das Reagenzglasgestell zurückgesetzt, ohne den Niederschlag dabei aufzuwirbeln. Mit Hilfe einer Unterdruck-Absaugvorrichtung wird der Überstand so schnell wie möglich über eine dünne Plastikkanüle abgesaugt, so daß der Niederschlag am Boden haften bleibt.

2.3.3.10 Messung der Radioaktivität

Die Messung der Gesamtaktivität sowie der Aktivität im Niederschlag erfolgt schließlich im Gammaszintillationszähler. Die Gesamtaktivität lag zwischen 15000 und 30000 cpm. Die Radioaktivitätswerte werden direkt über einen mit dem Zähler verbundenen Rechner ausgedruckt.

2.3.4 Auswertung

Zur Auswertung des RIA wird zunächst eine semi-logarithmische Graphik angefertigt, die die Standardkurven und die einzelnen Serumverdünnungskurven enthält.

Wie aus Abb.6 hervorgeht, sind auf der logarithmischen X-Achse die Konzentrationen für den Standard eingezeichnet. Die vorgegebenen Verdünnungsschritte, z.B. 1:2 (= 100 µl unverdünntes Serum), 1:8 (= 25 µl unverdünntes Serum), 1:32 usw. sind ebenfalls auf der X-Achse aufgetragen.

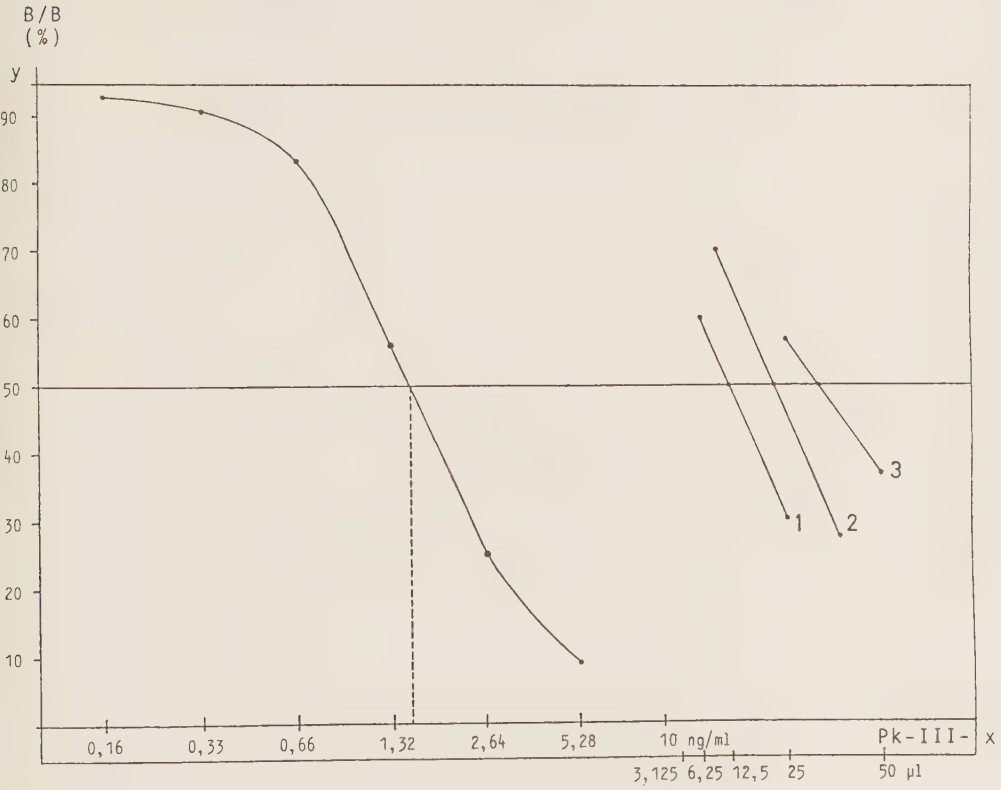


Abb.6 Graphische Darstellung der Standardkurve und mehrerer Serumverdünnungskurven (1 - 3) zur Ermittlung der Pk-III-Konzentration

Auf der linearen Y-Achse erscheinen die Inhibitionsquotienten B/B_0 in %. Die Konzentration des Serum-Prokollagen wird dann wie folgt ermittelt:

- 1) Es wird der Quotient $\% B/B_0$ für alle Meßwerte sowohl des Standards als auch der Serumverdünnungen durch Division der gemessenen Impulsraten (in Ipm) durch die Impulsrate des Standards S_0 (in Ipm) und Multiplikation mit 100 ermittelt.

$$\frac{I_{pm}}{I_{pm_0}} \times 100 = \% B/B_0$$

- 2) Trägt man diese Werte gegen die zugehörigen Pk-III-Peptid-Konzentrationen des Standards $S_0 - S_5$ auf, so erhält man die sigmaförmige "ideale" Standardkurve.
- 3) In gleicher Weise zeichnet man die $\% B/B_0$ -Werte der Serumverdünnungen sowie die entsprechenden im Assay eingesetzten Serumvolumina ein und verbindet die Meßpunkte miteinander.
- 4) Es wird das Serumvolumen aus der Verdünnungskurve am 50% B/B_0 - Bindungswert (50% Intercept = 50% IC) ermittelt. Dieses läßt sich zur Pk-III-Konzentration des Standards bei 50% Inhibition in Beziehung setzen. Zur Konzentrationsbestimmung des Serum-Prokollagen ergibt sich daraus die folgende Formel:

$$\frac{C_{\text{Pk-III-Peptid}}}{C_{50\% \text{ IC, Stand.-Kurve}}} = \frac{200 \mu\text{l}}{\text{Vol. } 50\% \text{ IC, Serum } \mu\text{l}}$$

wobei:

$C_{\text{Pk-III-Peptid}}$ = Konzentration Pk-III-Peptid im Serum in ng/ml

$C_{50\% \text{ IC, Stand.-Kurve}}$ = Konzentration Pk-III-Peptid für 50% B/B_0 -Bindungswert der Standardkurve

$\text{Vol. } 50\% \text{ IC, Serum } \mu\text{l}$ = Serumvolumen für 50% B/B_0 -Bindungswert der Serumverdünnungskurve in μl

3 ERGEBNISSE

3.1 Serumkonzentration bei Gesunden und bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung

Mit Hilfe dieses RIA wurden die Serum-Pk-III-Peptidspiegel von 54 M.Crohn-Patienten, 9 an Colitis ulcerosa Erkrankten sowie 16 gesunden Kontrollpersonen bestimmt.

Der Normbereich für die Gesunden im Alter von 18 - 57 Jahren lag zwischen 2 und 13 ng/ml. Patienten mit Colitis ulcerosa hatten Pk-III-Konzentrationen zwischen 4 und 10 ng/ml. Für Patienten, die an M.Crohn erkrankt waren, fanden sich Werte zwischen 3 und 30 ng/ml.

Die Einzeldaten für die drei Gruppen sind in Abb.7 dargestellt. Hierbei ist gleichzeitig eine Ordnung nach Altersgruppen vorgenommen. Die höchsten Pk-III-Konzentrationen (17 bzw. 30 ng/ml) fanden sich bei 2 weiblichen Patienten mit M.Crohn, die 17 Jahre alt waren.

Tab.III zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der drei Kollektive.

Tab.III Pk-III-Konzentration im Serum bei Patienten mit Colitis ulcerosa und M.Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen

Gruppen	n	Pk-III-Konzentration Mittelwerte + Standardabweichung	p im Vergleich zu Kontrollen
1 Kontrollen	16	7,7 $\pm$ 3,4	
2 Colitis ulcerosa	9	7,0 $\pm$ 2,4	> 0,05
3 M.Crohn	54	8,1 $\pm$ 4,5	> 0,05

Sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$), obwohl die Pk-III-Konzentrationen bei Patienten mit M.Crohn im Mittel am höchsten lagen.

3.2 Darstellung der Prokollagen-III-Peptidspiegel nach verschiedenen Gesichtspunkten bei M.Crohn

Um zu sehen, ob nur bestimmte Untergruppen von Patienten mit M.Crohn erhöhte Pk-III-Konzentrationen aufweisen, wurden die Daten dieser Patienten nach verschiedenen Gesichtspunkten genauer analysiert und graphisch dargestellt (Abb.8 - 10).

- 1) Abb.8 zeigt eine Korrelation des Pk-III-Peptidspiegels mit der Krankheitsaktivität. Für Patienten mit niedriger Aktivität ($\text{CDAI} < 100$) ergab sich ein Mittelwert von 9,3 ng/ml, mit mittlerer Aktivität ($\text{CDAI} 100 - 150$) von 7,8 ng/ml und mit höherer Aktivität ($\text{CDAI} > 150$) von 6,7 ng/ml. Aus diesen Daten läßt sich statistisch kein Bezug zur klinischen Aktivität ableiten, abgesehen von etwas erhöhten Werten bei niedriger klinischer Aktivität ($p > 0,05$).

Als obere Normgrenze ist in Abb.8 - 10 die höchste von uns bei Gesunden gemessene Konzentration von 13 ng/ml eingetragen.

In Abb.8 sind außerdem zwei Einzelverläufe eingetragen. Bei einer Patientin war die Bestimmung vor und zweimal im Laufe einer Prednisolon-Therapie durchgeführt worden. Es ergab sich keine Änderung des Pk-III-Peptidspiegels (●—●—●). Für eine andere Patientin sind die Prokollagen-Konzentrationen vor bzw. im Verlauf einer Schwangerschaft dargestellt (●-----●). Nach einigen Schwangerschaftswochen war ein Ansteigen des Pk-III-Peptidspiegels festzustellen.

- 2) Ferner wurde untersucht, ob sich nach einer vorangegangenen Darmresektion am Prokollagenspiegel eventuell Hinweise auf ein Rezidiv ablesen lassen (Abb.9). Patienten mit Rezidiv wiesen eine mittlere Konzentration von 6,9 ng/ml, Patienten ohne Rezidiv eine solche von 10,2 ng/ml auf. Beide Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant von dem bei nicht-operierten M.Crohn - Patienten gefundenen Mittelwert von 7,6 ng/ml ($p > 0,05$).
- 3) Da die Fibrosierungstendenz im Darmgewebe mit der Länge der Erkrankung zunimmt, wurden die Daten auch nach kürzerer bzw. längerer Krankheitsdauer getrennt aufgetragen (Abb.10). Bei Patienten, deren Erkrankung weniger als 3 Jahre bestand, waren die Pk-III-Peptidspiegel mit im Mittel 8,7 ng/ml statistisch nicht anders als bei denen mit längerer Erkrankungsdauer (7,7 ng/ml).

3.3. Prokollagen-III-Peptidspiegel bei Leberfibrose

Um die Ergebnisse bei den Patienten mit chronischen Darmerkrankungen auch quantitativ in Beziehung zu setzen mit Krankheitszuständen, von denen eindeutige Erhöhungen der Serum-PK-III-Konzentration bekannt sind, wurden parallel 22 Patienten mit chronisch-fibrosierenden Leberleiden untersucht. Bei Leberfibrose ergab sich eine große Streubreite der Prokollagen-Konzentrationen. Werte bis zu 160 ng/ml fanden sich für Patienten mit Leberzirrhose alkoholischer Genese. Auch bei chronisch-aktiver Hepatitis lagen die PK-III-Spiegel deutlich oberhalb der Norm (Abb.11).

Bei einem Mittelwert von 53,4 ng/ml $\pm$ 57,9 Standardabweichung läßt sich eine statistisch signifikante Erhöhung des Pk-III-Peptidspiegels im Serum von Leberfibrose-Patienten feststellen ($p < 0,05$).

Im Serum eines jungen Mannes mit chronisch-aggressiver Hepatitis B, dessen Erkrankung unter virostatistischer Behandlung in Remission kam, ging die Pk-III-Konzentration im Verlauf deutlich zurück (•-----•, 37).

ng/ml Pk-III

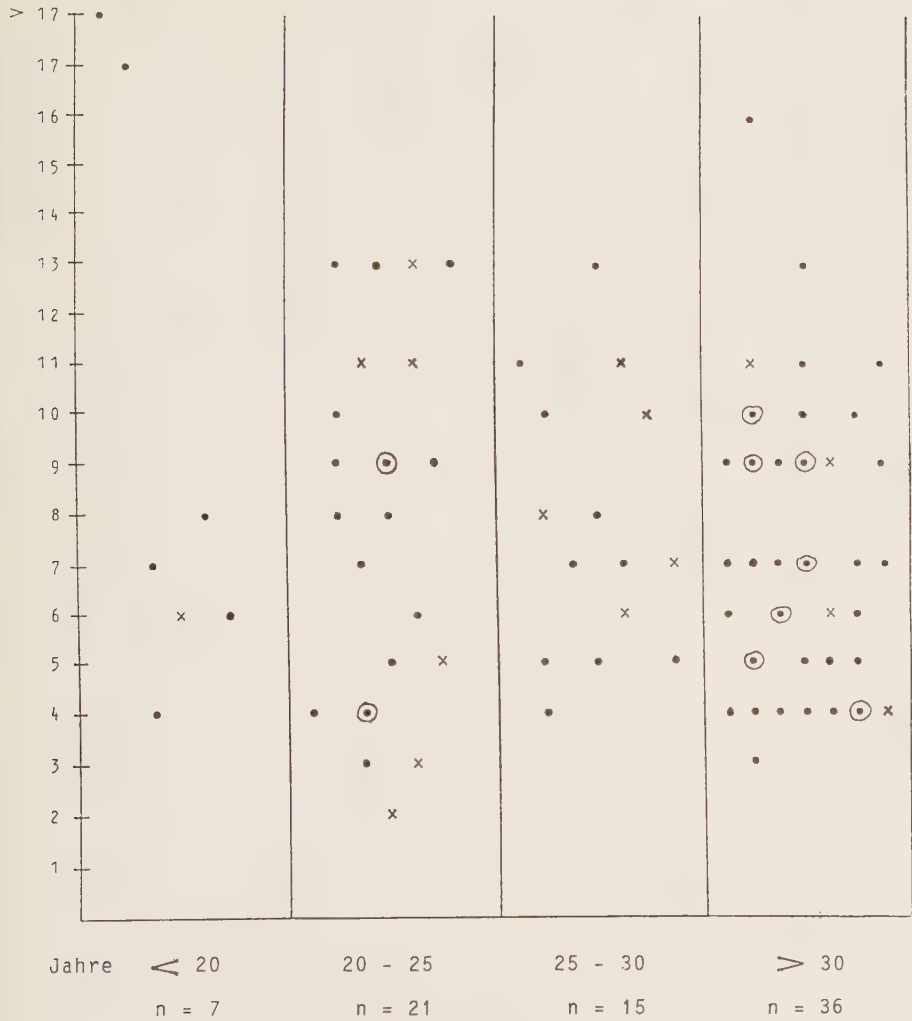


Abb. 7 Pk-III-Konzentration im Serum bei
Gesunden (x) und Patienten mit
Colitis ulcerosa (⊙) oder M.Crohn (•),
geordnet nach Altersgruppen

ng/ml Pk-III-

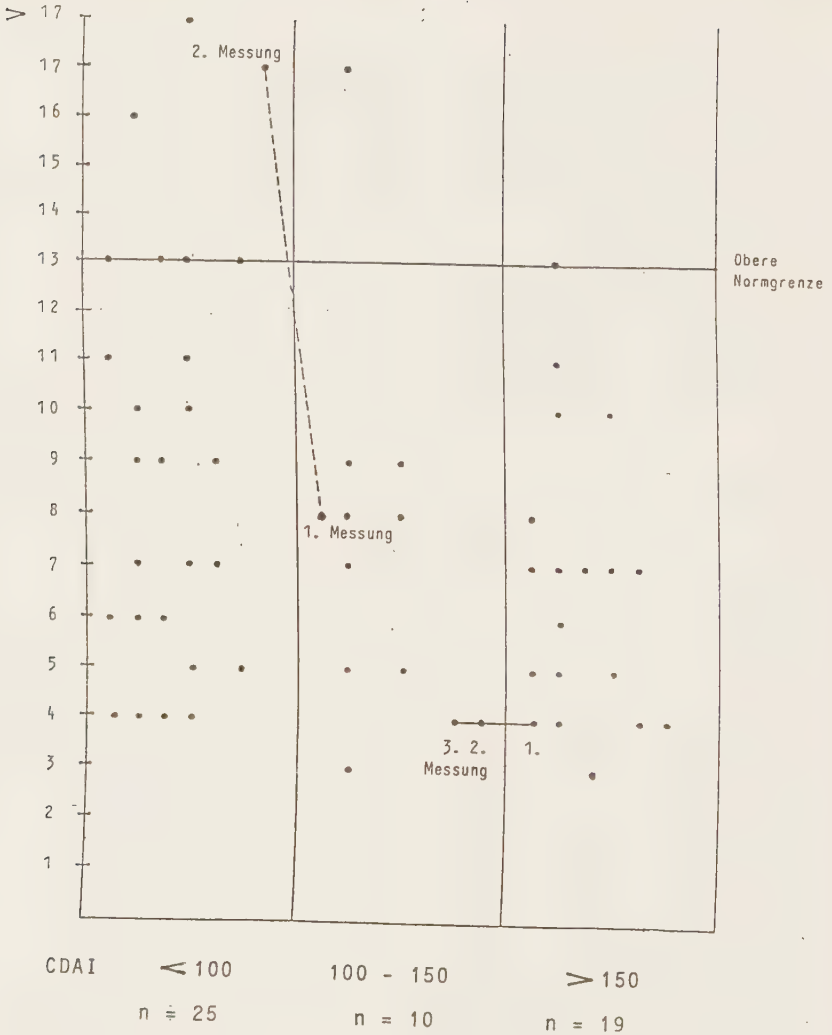


Abb.8 Pk-III-Konzentration im Serum bei M.Crohn, aufgliedert nach Krankheitsaktivität gemäß dem CDAI nach Best (8)

- Solide verbundene Werte: Absinken des CDAI im Laufe einer Prednisolon-Therapie
- Gestrichelt verbundene Werte: Ansteigen des Pk-III-Spiegels nach einigen Schwangerschaftswochen

ng/ml Pk-III

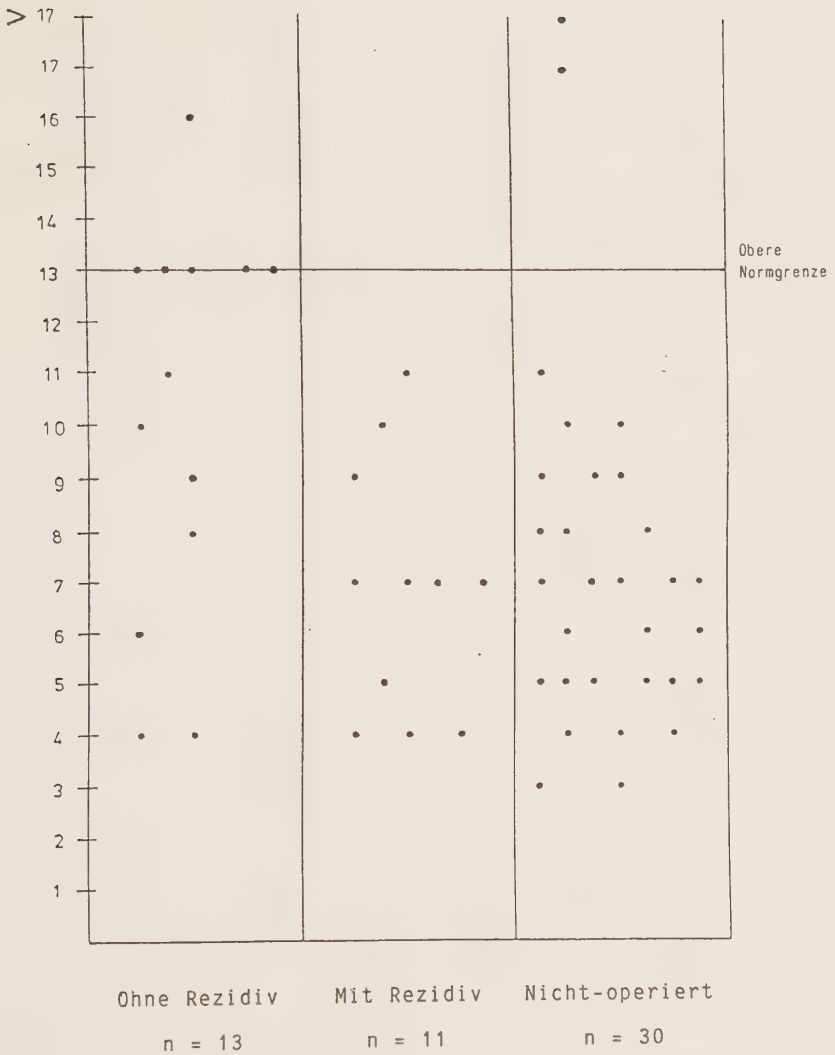


Abb.9 Pk-III-Konzentration im Serum bei nicht-operierten und resezierten Patienten mit oder ohne Rezidiv bei M.Crohn

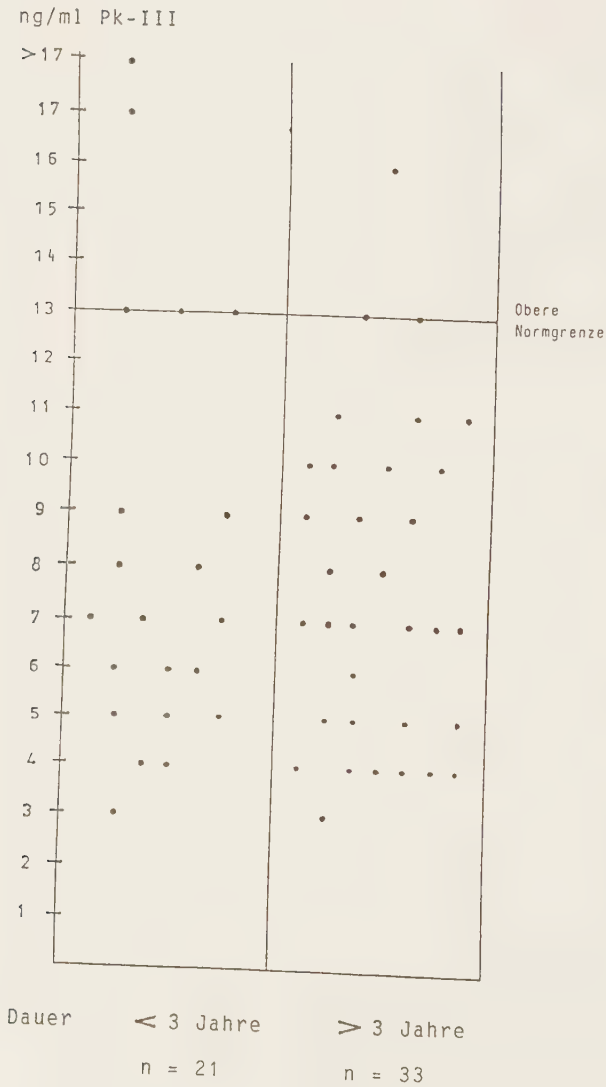


Abb.10 Pk-III-Konzentration im Serum bei Patienten mit M.Crohn, aufgegliedert nach Krankheitsdauer

ng/ml PK-III

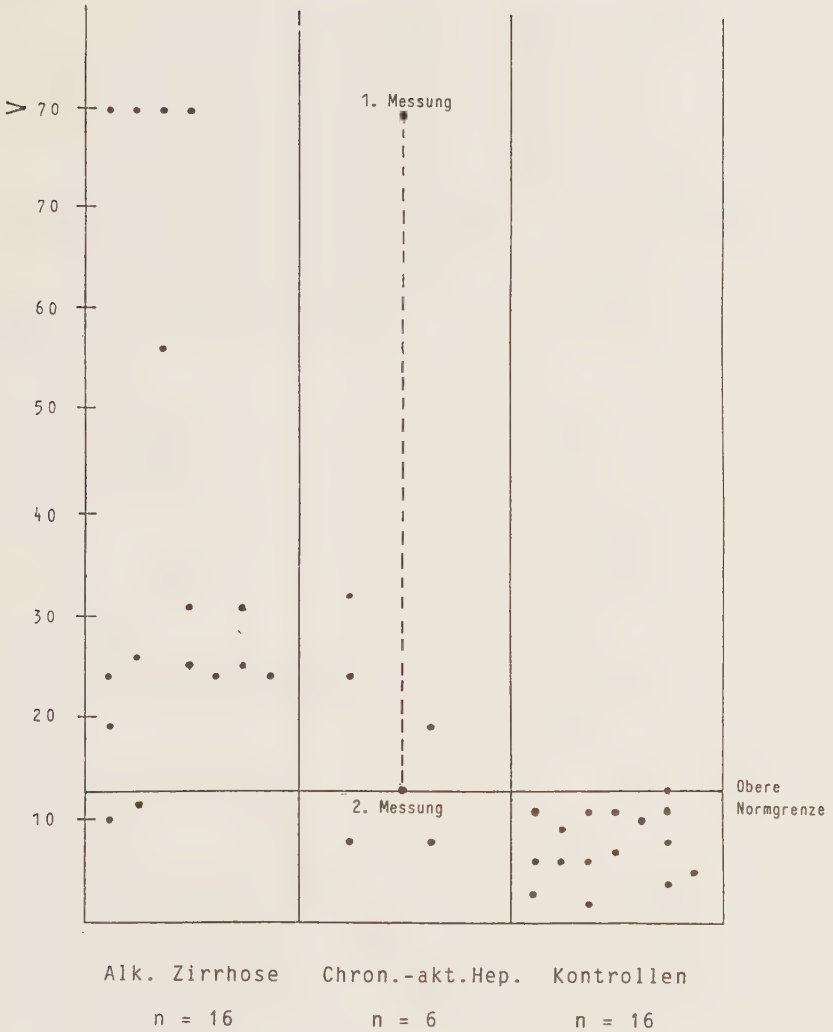


Abb.11 Leberfibrose - Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen

- Gestrichelt verbundene Werte:
Absinken des PK-III-Spiegels
nach virostatischer Therapie

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Einen Gesamtüberblick über die Untersuchung gibt Tab.IV. Auch die Mittelwerte und Standardabweichungen sämtlicher Untergruppen bei M.Crohn unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollen ($p > 0,05$), im Gegensatz zu der signifikanten Erhöhung bei Patienten mit Leberfibrose ($p < 0,05$). Nur der Vergleich der Altersgruppen < 20 Jahre und > 30 Jahre ergibt bei Zusammenfassung aller Gruppen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

Tab.IV Zusammenfassung der Ergebnisse bei
Kontrollen sowie Patienten mit Colitis
ulcerosa, M.Crohn und Leberfibrose

Gruppen und Untergruppen	n	Pk-III-Konzentration Mittelwerte + Standardabweichung
1 Kontrollen	16	7,7 $\pm$ 3,4
2 Colitis ulcerosa	9	7,0 $\pm$ 2,4
3 M.Crohn		
CDAI $\leq$ 100	25	9,3 $\pm$ 5,6
CDAI 100 - 150	40	7,8 $\pm$ 3,8
CDAI $>$ 150	19	6,7 $\pm$ 2,7
OP ohne Rezidiv	13	10,2 $\pm$ 4,1
OP mit Rezidiv	11	6,9 $\pm$ 2,4
Nicht-operiert	30	7,6 $\pm$ 5,1
Dauer $\leq$ 3 Jahre	21	8,7 $\pm$ 6,0
Dauer $>$ 3 Jahre	33	7,7 $\pm$ 3,2
Alter (Gruppen 1 - 3)		
$\leq$ 20 Jahre	7	11,2 $\pm$ 9,3
20 - 25 Jahre	21	7,8 $\pm$ 3,6
25 - 30 Jahre	15	7,6 $\pm$ 2,8
$>$ 30 Jahre	36	7,4 $\pm$ 3,0
4 Leberfibrose	22	53,4 $\pm$ 57,9

4 DISKUSSION

4.1 Zur Methodik

4.1.1 Veränderung des Testbestecks

Zu Versuchsbeginn bestand für die Durchführung des Assays lediglich eine vorläufige Arbeitsanleitung. Erst zu einem späteren Zeitpunkt war der Test dann kommerziell verfügbar. Die Methodik änderte sich dadurch nur unwesentlich. Der zweite Ak war als gebrauchsfertige Suspension erhältlich. Die Standardseren mußten nicht mehr schrittweise verdünnt werden, sondern wurden mit vorgegebenen Konzentrationen geliefert. Die Inkubationszeiten zwischen den einzelnen Arbeitsgängen änderten sich. Erst bei der Durchführung der letzten 3 RIA konnte ein Testserum mit vorgegebener Konzentration eingesetzt werden. Daher wurde in der Methodik auf Angaben zur Inter-Assay-Reproduzierbarkeit verzichtet. Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Assays war mit einem Variationskoeffizienten von 3,6%, der aus 16 Proben abgeleitet wurde, jedoch sehr gut.

4.1.2 Bedeutung der Antigenität für den Radioimmunoassay

Bei der Auswertung der Assays fällt die unterschiedliche Neigung der Serumverdünnungskurven untereinander und gegenüber der Standardkurve auf. Dieses Phänomen liegt in der Heterogenität des Ag Col 1 - 3 begründet (45).

Es erhebt sich daher die Frage, welche Strukturen im PK-III-Molekül antigene Wirkung besitzen und welche davon bei der radioimmunologischen Bestimmung eine Rolle spielen.

Bisher konnten etwa 5 verschiedene Lokalisationen als antigene Strukturen im Pk-III-Molekül identifiziert werden (65).

- 1) Helikale Determinanten zentral in einer alpha-Kette
- 2) Determinanten in der alpha-Kette im entfalteten Zustand
- 3) An den Enden der alpha-Kette
- 4) Am carboxy-terminalen Ende
- 5) Am amino-terminalen Ende

Eine starke Antigenität soll dabei vor allem der nicht-helikale Bereich Col 2 besitzen, dagegen Col 1 und Col 3 eine schwächere antigene Aktivität (5, 47). Für Pk-III im Serum wurde das Propeptid Col 1 - 3 als relevantes Ag postuliert.

Die praktische Bedeutung für den RIA liegt darin, daß verschiedene Antigene mit unterschiedlichem Molekulargewicht gegenüber dem Referenzpeptid des Standards in Form von Col 1, 2, 3 bzw. Col 1 - 3 bei der Messung im Serum erfaßt werden können.

Diese Heterogenität der Antigene im menschlichen Serum spiegelt sich graphisch in der unterschiedlichen Neigung der Inhibitionskurven, bezogen auf den Standard, wieder (44, 45, siehe auch Abb.6).

Ein weiterer Grund dürfte in der unterschiedlichen Antigenität zwischen dem Rinderpeptid und dem antigenen Material im menschlichen Serum liegen. Trotz der hohen Kreuzreaktivität zwischen

Rinder- und menschlichem Prokollagen liegen die Standard- und Serum-Verdünnungskurven nicht ganz parallel (45, 52).

Die Pk-III-Peptidspiegel können daher nicht direkt aus der Standardkurve abgelesen werden, sondern werden erst aus der Bestimmung des 50% IC - Wertes, bezogen auf den 50% IC - Wert der Standardkurve, ermittelt.

4.2 Zu den Ergebnissen

4.2.1 Normbereich

Um die Prokollagen-Konzentrationen für M.Crohn- und Leberfibrose-Patienten interpretieren zu können, muß man zunächst den Normbereich für Gesunde festlegen. Der in dieser Untersuchung ermittelte Bereich zwischen 2 und 13 ng/ml (Mittelwert $7,7 \pm 3,4$ s) entspricht den Ergebnissen von Rohde et al. (52) und vom Test - Hersteller Behringwerke AG (6). Vom Hersteller wird ein Normbereich von 4 - 12 ng/ml mit einer Obergrenze von 15 ng/ml bei lebergesunden Erwachsenen angegeben.

4.2.2 Prokollagen-III-Peptidspiegel bei M.Crohn

In der Gruppe der an M.Crohn erkrankten Patienten fanden sich einige mit deutlich erhöhten Prokollagenspiegeln. Darunter waren 2 weibliche Jugendliche im Alter von 17 Jahren. Verschiedene Untersucher konnten eine Altersabhängigkeit der Prokollagen-Konzentration nachweisen. So fanden sich die höchsten Spiegel bei Neugeborenen mit Werten zwischen 250 und 300 ng/ml, wobei die Spiegel bis zum 20. Lebensjahr allmählich zur Norm absinken (6, 18, 66).

Trivedi et al. (66) fanden für die Gruppe der 9 - 16jährigen 24,4, ng/ml für die der 16 - 20jährigen 10,9 ng/ml Serum-Pk-III-Peptid im Mittel.

Auch während einer Schwangerschaft sind erhöhte Werte möglich, die sich innerhalb von 8 Wochen post partum normalisieren (6). Ein derartiger Verlauf ist in Abb.8 dargestellt, wobei der Normwert vor der Schwangerschaft gemessen wurde.

Ein Einzelwert von 16 ng/ml stammt von einer 54jährigen Patientin. Auch Rohde et al. sahen in höherem Alter einen leichten Pk-III-Anstieg (52).

Bei der Beurteilung erhöhter Prokollagen-Konzentrationen ist ferner auf die Leber- und Nierenfunktion der Patienten zu achten. Bei renaler Funktionseinschränkung können die Werte bis zum 8-fachen der Norm ansteigen und nach Normalisierung wieder absinken (52).

Bei den hier untersuchten Patienten konnte eine Funktionseinschränkung aufgrund normaler Kreatininwerte weitgehend ausgeschlossen werden. 2 Patienten zeigten laborchemisch pathologische Leberparameter. Die Prokollagen-Konzentration lag jedoch im Normbereich.

Insgesamt konnte eine Prokollagenerhöhung im Serum von M.Crohn - Patienten nicht nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für die Gesamtgruppe aller Patienten mit M.Crohn als auch für Untergruppen, die nach dem gebräuchlichen klinischen Aktivitätsindex, dem CDAI, nach dem Auftreten eines Rezidivs nach "kurativer" Resektion und nach der Dauer der Erkrankung analysiert wurden.

Da von insgesamt 54 Patienten mit M.Crohn nur 3 einen Pk-III-Wert hatten, der oberhalb der höchsten bei unseren Kontrollen gemessenen Serumkonzentration von 13 ng/ml lag, und 2 dieser höheren Konzentrationen wahrscheinlich durch jugendliches Alter bedingt waren, wurden weitere Untergruppen - Analysen nach anderen Indices oder Laborparametern nicht mehr unternommen. Auch bei Colitis ulcerosa fanden wir durchwegs normale Serumkonzentrationen von Pk-III-.

4.2.3 Prokollagen-III-Peptidspiegel bei Leberfibrose

Im Gegensatz zu den Befunden bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen fanden auch wir bei Patienten mit fibrosierenden Leberkrankheiten deutliche Erhöhungen der Serum-Pk-III-Konzentration. Unter 16 Patienten mit Leberzirrhose alkoholischer Genese und 6 Patienten mit CAH war nur bei 4 Patienten die Serum-Pk-III-Konzentration nicht erhöht.

Insbesondere Rohde et al., die maßgeblich an der Entwicklung des Pk-III-Peptid RIA beteiligt waren, führten entsprechende Messungen an Leberkranken durch. Abhängig vom Ausmaß der Fibrosierung, damit in guter Korrelation zum Grad der Kollagen-III-Bildung in der Leber, beschrieben sie erhöhte Werte für Pk-III-Peptid im Serum. Der höchste Anstieg fand sich bei alkoholischer Leberkrankheit mit Pk-III-Spiegeln bis zu 160 ng/ml. Unsere eigenen Messungen stimmen mit diesen Angaben gut überein.

Im Rahmen einer Virushepatitis kommt es initial zu sehr hoher Konzentration mit einem Absinken zur Norm nach Abheilung der Erkrankung. Ein Persistieren von erhöhtem Pk-III-Peptid nach einigen Monaten gilt als Hinweis für den Übergang in eine CAH (1).

Diesen Zusammenhang illustriert umgekehrt der Verlauf einer CAH vor und nach virostatistischer Behandlung bei einem unserer Patienten (37), bei dem die PK-III-Konzentration nach klinischer Remission drastisch absank (Abb.11).

Im übrigen waren die Prokollagenwerte, wie dieselbe Abb. zeigt, nicht so deutlich erhöht wie bei Leberzirrhose. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Untersucher (1, 52, 68).

Bei anderen Lebererkrankungen wie z.B. chronisch-persistierender Hepatitis zeigen sich dagegen normale Peptidspiegel (50, 68).

Ob der PK-III-Peptidspiegel die vermehrte Ablagerung oder den Abbau des Kollagen Typ-III-widerspiegelt, ist nicht vollständig geklärt. Neuere Untersuchungen bei experimenteller Leberzirrhose am Rattenmodell zeigen analoge Befunde wie am Menschen (58). Danach reflektiert erhöhtes Serum-Pk-III-Peptid eher eine vermehrte Synthese von Kollagen in der Leber.

Die Bestimmung des amino-terminalen Pk-III-Peptids bietet somit einen biochemischen Parameter zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von fibrosierenden Leberkrankheiten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Möglichkeit der Bestimmung von Pk-III-Peptid im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten mittels eines RIA wurde die klinische Diagnostik fibrosierender Erkrankungen erweitert.

Nach bisher vorliegenden Studien besteht eine gute Korrelation zwischen der Höhe des Pk-III-Peptidspiegels im Serum bei chronischen Lebererkrankungen und dem Ausmaß der Fibrosierung und der damit verbundenen Kollagenablagerung in der Leber.

Da auch bei chronisch-entzündlicher Darmerkrankung eine Fibrosierung mit erhöhtem Kollagen-III-Stoffwechsel stattfindet, sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Pk-III-Peptidspiegels im Serum und der Aktivität der Erkrankung besteht.

Die Pk-III-Peptid-Konzentrationen von Patienten mit Colitis ulcerosa lagen sämtlich im Normbereich. Bei M.Crohn waren einzelne Serumspiegel leicht erhöht, jedoch ohne Bezug zum Aktivitätsindex nach Best. Bei einer Aufgliederung nach Krankheitsdauer oder nach nicht-operierten bzw. resezierten Patienten mit oder ohne Rezidiv ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Von den 4 über der oberen Normgrenze liegenden Konzentrationen waren die 3 am deutlichsten erhöhten durch krankheitsunabhängige Faktoren wie jugendliches Alter bzw. Schwangerschaft zu erklären.

Dagegen konnten für fibrosierende Lebererkrankungen in Übereinstimmung mit den bisher vorliegenden Studien deutlich erhöhte Pk-III-Peptidspiegel im Serum nachgewiesen werden.

Anders als bei fibrosierenden Lebererkrankungen ist daher der Pk-III-Peptid-RIA zur Diagnose und Verlaufskontrolle chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen nicht geeignet.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Annoni G., Carguel A., Colombo M., Hahn E.G.:
Serumprokollagen als Index für die Entwicklung
einer chronisch aktiven Virus-Hepatitis
Z. Gastroenterol. 19, 529, abstr. (1981)

- 2 Bächinger H.P., Bruckner P., Timpl R., Engel J.:
The role of cis-trans isomerization of peptide
bonds of the coil $\rightarrow$ triple helix conversion
of collagen
J. Biochem. 90, 605 - 613 (1978)

- 3 Bächinger H.P., Bruckner P., Timpl R.,
Prockop D.J., Engel J.:
Folding mechanism of the triple helix in
type III collagen and type -III-pN-collagen
Am. J. Biochem. 106, 619 - 632 (1980)

- 4 Bächinger H.P., Fessler L.I., Timpl R., Fessler J.H.:
Chain assembly intermediate in the biosynthesis
of type III procollagen in chick embryo blood
vessels
J. Biol. Chem. 256, 13193 - 13199 (1981)

- 5 Becker U., Nowack H., Gay S., Timpl R.:
Production of specificity of antibodies against
the aminoterminal region in type III collagen
Immunology 31, 57 - 65 (1976)

- 6 Behringwerke AG
RIA - gnost^(R) Prokollagen-III-Peptid
Besteck zur radioimmunologischen Bestimmung
von Prokollagen-III-Peptid
Marburg 10.83

- 7 Berg R.A., Prockop D.J.:
Purification of procollagen and its
hydroxylation by prolyl hydroxylase
Biochemistry 12, 3395 - 3401 (1973)
- 8 Best W.R., Bechtel J.M., Singleton J.W., Kern F.:
Development of a crohn's disease activity index
Gastroenterology 70, 439 - 444 (1976)
- 9 Boedtker H., Crkvenjakov R.B., Last J.A., Doty P.:
The identification of collagen messenger RNA
Proc. Nat. Acad.Sci. USA 71, 4208 - 4212 (1974)
- 10 Boedtker H., Frischauf A.M., Lehrach H.:
Isolation and translation of calvaria
procollagen messenger ribonucleic acids
Biochemistry 15, 4765 - 4770 (1976)
- 11 Brownwell A.G., Veis A.:
Intracellular location of triple helix
formation of collagen
J. Biol. Chem. 251, 7137 - 7143 (1976)
- 12 Bruckner P., Bächinger H.P., Timpl R., Engel J.:
Three conformationally distinct domains in the
aminoterminal segment of type III procollagen and
its rapid triple helix $\rightleftharpoons$ coil transition
J. Biochem. 90, 595 - 603 (1978)
- 13 Byers P.H., Click E.M., Harper E., Bornstein P.:
Interchain disulfide bonds in procollagen are
located in a large nontriple - helical
COOH - terminal domain
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3009 - 3013 (1975)

- 14 Chambers T.J., Morson B.C.:
The granuloma in Crohn's disease
Gut 20, 269 - 274 (1979)
- 15 Christner P.J., Rosenbloom J.:
A comparison of transfer RNA isoaccepting
species between collagenous and noncollagenous
tissues in the embryonic chick
Archs. Biochem. Biophys. 172, 399 - 409 (1976)
- 16 D'Ardenne A.J., Burns J., Sykes B.C.,
Kirkpatrick P.:
Comparative distribution of fibronectin and
type III collagen in normal human tissues
J. Pathol. 141, 55 - 69 (1983)
- 17 Davidson J.N., McEneaney L.S.G., Bornstein P.:
Intermediates in the conversion of
procollagen to collagen
Eur. J. Biochem. 81, 349 - 355 (1977)
- 18 Epstein E.H.:
I α 1(III)I, human skin collagen: Release by
pepsin digestion and preponderance in fetal life
J. Biol. Chem. 249, 3225 - 3231 (1974)
- 19 Epstein E.H., Munderloh N.H.:
Isolation and characterization of CNBr peptides
of human I α 1(III)I, collagen and tissue
distribution of I α 1(I)I, α 2 and I α 1(III)I, collagens
J. Biol. Chem. 250, 9304 - 9312 (1975)
- 20 Etzrodt H., Schleyer M., Schröder K.-E.,
Pfeiffer E.F.:
The use of tween 20 in the double antibody
radioimmunoassay
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1205 - 1208 (1976)

- 21 Eyre D.R.:
Collagen: Molecular diversity of the body's
protein scaffold
Science 207, 1315 - 1321 (1980)
- 22 Fahrländer H.:
Colitis ulcerosa und Enterocolitis Crohn,
Gemeinsames und Unterschiede
Med. Klin. 70, 1583 - 1594 (1975)
- 23 Fessler J.H., Fessler L.I.:
Biosynthesis of procollagen
Ann. Rev. Biochem. 47, 129 - 162 (1978)
- 24 Fessler L.I., Fessler J.H.:
Characterization of type III procollagen from
chick embryo blood vessels
J. Biochem. 254, 233 - 239 (1979)
- 25 Fessler L.I., Morris N.P., Fessler J.H.:
Procollagen: Biological scission of amino
and carboxyl extension peptides
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4905 - 4909 (1975)
- 26 Gerard St., Williams R.C., Mitchell W.M.:
Physical and chemical properties of human
type III procollagen
Biochemistry 22, 1289 - 1297 (1983)
- 27 Glanville R.W., Allmann H., Fietzek P.P.:
Cystein residues mark the c-terminal triple
helical, non triple helical junction of type III
collagen
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1663 - 1665 (1976)

- 28 Goldberg B., Taubman M.B., Radin A.:
Procollagen peptidase: its mode of action
on the native substrate
Cell 4, 45 - 50 (1975)
- 29 Grant M.E., Jackson D.S.:
The biosynthesis of procollagen
Essay Biochem. 12, 77 - 113 (1976)
- 30 Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S.:
The preparation of J^{131} labelled human growth
hormon of high specific radioactivity
Biochem. J. 89, 114 - 123 (1963)
- 31 Hahn E.G., Martini G.A.:
Clinical parameters of fibroplasia
Ital. J. Gastroenterol. 12, 41 - 46 (1980)
- 32 Hahn E.G., Martini G.A.:
Diagnostische Parameter der Kollagenbiosynthese
Internist 21, 195 - 201 (1980)
- 33 Hahn E.G., Ott U., Martini G.A.:
Die Leberzirrhose
Z. Gastroenterol. 18, 453 - 469 und 507 - 523 (1980)
- 34 Harwood R., Grant M.E., Jackson D.S.:
Studies on the glycosylation of hydroxylysine
residues during collagen biosynthesis and the
subcellular localisation of collagen
galactosyltransferase and collagen glucosyl-
transferase in tendon and cartilage cells
Biochem. J. 152, 291 - 302 (1975)
- 35 Kivirikko K.I., Ryhänen L., Anttinen H.,
Bornstein P., Prockop D.J.:
Further hydroxylation of lysyl residues in
collagen by procollagen lysylase in vitro
Biochemistry 12, 4966 - 4971 (1973)

- 36 Kühn.K.:
 The structure of collagen
 Essays of Biochemistry 5, 59 - 87
 Academic Press, London and New York 1969
- 37 Loeschke K., Abb J., Farack U.M., Wiebecke B.:
 Treatment of HBsAg-, HBeAg-positive chronic
 active hepatitis with adenine arabinoside
 A case report with clinical remission and
 seroconversion to anti-HBs
 Hepato-gastroenterol. 32, 178 - 180 (1985)
- 38 Low R.B., Cutroneo K.R., Davis G.S., Giancola M.S.:
 Lavage type III procollagen N-terminal peptides
 in human pulmonary fibrosis and sarcoidosis
 Lab. Invest. 48, 755 - 759 (1983)
- 39 Lukens.L.N.:
 Time of occurence of disulfide linking
 between procollagen chains
 J. Biol. Chem. 251, 3530 - 3538 (1976)
- 40 Miller E.J.:
 Biochemical characteristics and biochemical
 significance of the genetically distinct collagens
 Mol. Cell. Biochem. 13, 165 - 192 (1976)
- 41 Morson B.C., Dowsen I.M.P.:
 Gastrointestinal Pathology, 294 - 308
 Blackwell Scientific Publications, 2nd edition
 Oxford, London, Edinburgh, Melbourne 1979
- 42 Moss A.J., V.Dalrymple G., Boyd Ch.M.:
 Practical radioimmunoassay
 The C.V.Mosby Company, Saint Louis 1976

- 43 Myllylä R., Risteli L., Kivirikko K.I.:
Glucosylation of galactosylhydroxylsyl residues
collagen in vitro by collagen glucosyltransferase
Eur. J. Biochem. 58, 517 - 521 (1975)
- 44 Niemelä O., Risteli L., Sotaniemi E.A., Risteli J.:
Aminoterminal propeptide of type III procollagen
in serum in alcoholic liver disease
Gastroenterology 85, 254 - 259 (1983)
- 45 Niemelä O., Risteli L., Sotaniemi E.A., Risteli J.:
Heterogeneity of the antigens related to the
aminoterminal propeptide of type III procollagen
in human serum
Clin. Chim. Acta 124, 39 - 44 (1982)
- 46 Nowack H., Gay S., Wick G., Becker U., Timpl R.:
Preparation and use in immunohistology of
antibodies specific for type I and type III
collagen and procollagen
J. Immunol. Meth. 12, 117 - 124 (1976)
- 47 Nowack H., Olsen B.R., Timpl R.:
Characterization of the aminoterminal segment
in type III procollagen
J. Biochem. 70, 205 - 216 (1976)
- 48 Park E., Tanzer M.L., Church R.L.:
Procollagen synthesis in cell culture:
Nascent chain population consistent with
polycistronic mRNA
Biochem. Biophys. Res. Comm. 63, No.1 (1975)
- 49 Prockop D.J., Kivirikko K.I., Tuderman L., Guzman N.A.:
The biosynthesis of collagen and its disorders
New Engl. J. Med. 301, 77 - 83 (1979)

- 50 Raedsch R., Stiehl A., Waldherr R., Mall G., Gmelin K.,
Götz R., Walker S., Czygan P., Kommerell B.:
Procollagen-type-III-peptide serum concentrations in
chronic persistent and chronic active hepatitis and
in cirrhosis of the liver and their diagnostic value
Z. Gastroenterol. 20, 738 - 743 (1982)
- 51 Rohde H., Hahn E.G., Timpl R.:
Radioimmunoassay for aminoterminal procollagen
peptides in liver disease
Fresenius Z. Anal. Chem. 290, 151 - 152 (1978)
- 52 Rohde H., Vargas L., Hahn E.G., Kalbfleisch H.,
Bruguera M., Timpl R.:
Radioimmunoassay for type III procollagen peptide
and its application to human liver disease
Eur. J. Clin. Invest. 9, 451 - 459 (1979)
- 53 Ryhänen L., Kivirikko K.I.:
Hydroxylation of lysyl residues in native and
denatured procollagen by procollagen
lysyl hydroxylase in vitro
Biochim. Biophys. Acta 343, 129 - 137 (1974)
- 54 Schachter H., Kirsner J.B.:
Crohn's disease of the gastrointestinal tract
Clinical Gastroenterology 1 - 4
Willy Medical Publication, John Willy & Sons,
New York, Chichester, Brisbane, Toronto 1980
- 55 Schachter H., Kirsner J.B.:
Crohn's disease of the gastrointestinal tract
Clinical Gastroenterology 92 - 103
Willy Medical Publication, John Willy & Sons,
New York, Chichester, Brisbane, Toronto 1980
- 56 Scherr C.J., Goldberg B.:
Antibodies to a precursor of human collagen
Science 180, 1190 - 1191 (1972)

- 57 Schofield J.D., Uitto J., Prockop D.J.:
Formation of interchain disulfide bonds
and helical structure during biosynthesis
of procollagen by embryonic tendon cells
Biochemistry 13, 1801 - 1806 (1974)
- 58 Schuppan D., Dumont J.M., Kim K., Hennings G.,
Hahn E.G., Riecken E.O.:
Serumkonzentration des aminoterminalen Prokollagen
Typ III Peptids in der Ratte reflektiert frühe
Bindegewebsausbildung bei experimenteller Leber-
zirrhose
Persönliche Mitteilung
- 59 Speakman P.I.:
Proposed mechanism for the biological
assembly of collagen triple helix
Nature 229, 241 - 243 (1971)
- 60 Tanzer M.L.:
Cross-linking of collagen
Science 180, 561 - 566 (1973)
- 61 Tanzer M.L., Church R.L., Yaeger J.A.,
Wampler D.E., Park E.:
Procollagen: Intermediate forms containing
several types of peptide chains and non-collagen
peptide extensions at NH₂ and COOH ends
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3009 - 3013 (1974)
- 62 Taubman M.B., Goldberg B., Scherr C.J.:
Radioimmunoassay for human procollagen
Science 186, 1115 - 1117 (1974)
- 63 Taubman M.B., Kammerman S.:
Radioimmunoassay of procollagen in serum of
patients with Paget's disease of bone
Proc. Soc. Biol. Med. (N.Y.) 152, 284 - 287 (1976)

- 64 Timpl R., Risteli L.:
Radioimmunoassays in studies of connective
tissue proteins
Immunochemistry of the Extracellular Matrix
Vol. I, 199 - 235, Boca Raton 1982
- 65 Timpl R., Wick G., Gay S.:
Antibodies to distinct types of collagens and pro-
collagens and their application in immunohistology
J. Immunol. Meth. 18, 165 - 182 (1977)
- 66 Trivedi P., Cheeseman P., Portmann B.,
Hegarty J., Mowat A.P.:
Variation in serum type III procollagen peptide
with age in healthy subjects and its comparative
value in the assessment of disease activity in
children and adults with chronic active hepatitis
Eur. J. Clin. Invest. 15, 69 - 74 (1985)
- 67 Uitto J., Prockop D.J.:
Rate of helix formation by intracellular procollagen
and proto-collagen. Evidence for a role of
disulfide bonds
Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 904 - 911 (1973)
- 68 Weigand K., Frei A., Zimmermann A.:
Prokollagen-III-Peptid im Serum als Ausdruck der
Leberfibrose - Morphometrisches Korrelat
Z. Gastroenterol. 62, 518, abstr. (1981)
- 69 Wick G., Brunner H., Penner E., Timpl R.:
The diagnostic application of specific
antiprocollagen sera
Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 56, 316-324 (1978)
- 70 Wiestner M., Krieg Th., Hörlein D., Glanville R.W.,
Fietzek P., Müller P.K.:
Inhibiting effect of procollagen peptides on
collagen biosynthesis in fibroblast cultures
J. Biol. Chem. 254, 7016 - 7023 (1979)

LEBENS LAUF

Name: Klaus Peter Kaltenthaler

geboren am: 27. Oktober 1956

in: Frankfurt am Main / Hessen

Eltern: Dr. Albert und Gisela Kaltenthaler,
geb. Eichholz

Schulen: 1963 - 1967 Evang. Volksschule
Marktredwitz / Bayern

1967 - 1976 Neusprachliches
Gymnasium Marktredwitz

Abitur: 25. Juni 1976

Studium der
Medizin: 1976 - 1977 Universität Antwerpen /
Belgien

1977 - 1980 Johannes-Gutenberg-
Universität Mainz

1980 - 1983 Ludwig-Maximilians-
Universität München

2. Staatsexamen: 20. August 1982

3. Staatsexamen: 25. Oktober 1983

Approbation: 31. Januar 1984

Tätigkeit als
Assistenzarzt: Mai 1984 bis September 1985 in der
Urologischen Abteilung des Kreis-
krankenhauses Marktredwitz

Seit Oktober 1985 in der Inneren
Abteilung des Kreiskrankenhauses
Marktredwitz

Familienstand: ledig

